黑腹果蝇对丙酸的产卵避性反应及其生物学意义

王璐璐[1,#]，陈利荣[2,#]，朱景新[1]，王子光[2]，赵梓涵[1]，李曌芳[2]，刘　威[2,*]

（1. 山西医科大学汾阳学院临床医学系，山西汾阳 032200；
2. 山西医科大学汾阳学院医学检验系，山西汾阳 032200）

摘要：【目的】探究丙酸和丁酸对黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 产卵偏嗜性的影响，进一步研究其生物学意义。【方法】利用双选择食物装置检测黑腹果蝇雌性成虫产卵的偏嗜性，利用失去酸感受受体和外科摘除触角的果蝇研究介导该行为的感觉系统，通过发育历期与存活率评价果蝇产卵对丙酸产生避性反应的生物学意义。【结果】黑腹果蝇雌性成虫产卵对丙酸或丁酸产生避性反应，随浓度增大渐趋明显。*IR64a* 与 *IR76b* 突变体对 0.5% 丙酸避性反应减弱，产卵指数分别为 –0.07 和 –0.17。果蝇避开人粪便产卵，产卵指数达 –0.7 ~ –0.9，可能为其权衡对乙酸的偏嗜性和对丙酸避性反应的结果。*IR64a* 与 *IR76b* 突变体对人粪便避性反应明显减弱，产卵指数分别为 –0.49 和 –0.38。丙酸可显著延缓果蝇后代的发育历期和降低存活率，浓度越大效果越明显，2% 浓度时导致果蝇死亡。【结论】果蝇嗅觉系统介导了雌性成虫产卵对丙酸的避性反应，这种行为使果蝇产卵避开丙酸，使后代免受丙酸毒害，从而促进果蝇幼虫的发育和提高后代存活率。

关键词：黑腹果蝇；产卵避性反应；丙酸；人粪便；发育历期；存活率

中图分类号：Q968　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2017)12-1430-09

Oviposition avoidance of *Drosophila melanogaster* to propionic acid and its biological significance

WANG Lu-Lu[1,#], CHEN Li-Rong[2,#], ZHU Jing-Xin[1], WANG Zi-Guang[2], ZHAO Zi-Han[1], LI Zhao-Fang[2], LIU Wei[2,*] (1. Department of Clinical Medical, Fenyang College, Shanxi Medical University, Fenyang, Shanxi 032200, China; 2. Department of Medical Laboratory Science, Fenyang College, Shanxi Medical University, Fenyang, Shanxi 032200, China)

Abstract:【Aim】To explore the effects of propionic and butyric acids on the oviposition preference of *Drosophila melanogaster*, and to provide an insight into its biological significance.【Methods】The 2-choice apparatus was employed to assess the oviposition selection of *D. melanogaster* female adults. The flies with the acid-sensing gustatory receptors eliminated or the olfactory antennae surgically removed were used to investigate the oviposition-associated sensory system. The developmental duration and survival rate of the fruit fly were utilized to evaluate the biological significance of oviposition avoidance of *D. melanogaster* to propionic acid.【Results】*D. melanogaster* female adults displayed an oviposition avoidance to propionic and butyric acids in a dosage-dependent manner. The oviposition avoidance of *IR64a* and *IR76b* mutants to 0.5% propionic acid was completely impaired with the oviposition index of –0.07 and –0.17, respectively. The female adults repelled human feces to oviposit with the oviposition

基金项目：国家自然科学基金项目(31501175)；山西省高等学校大学生创新创业训练项目(2017537)；山西医科大学汾阳学院科技发展重点基金(2018C02)

作者简介：王璐璐，女，1997 年 11 月生，河南濮阳人，本科生，专业为临床医学，E-mail：moyilanlily@qq.com；陈利荣，男，1979 年 6 月生，山西神池人，硕士研究生，研究方向为疾病的分子遗传机制，E-mail：clr928@163.com

[#]并列第一作者 Authors with equal contribution

[*]通讯作者 Corresponding author，E-mail：liuwei@sxmu.edu.cn

收稿日期 Received：2017-08-03；接受日期 Accepted：2017-09-24

index of −0.7 − −0.9, which may be explained by a balanced decision to the attractiveness to acetic acid and the avoidance to propionic acid. *IR64a* and *IR76b* mutants showed less oviposition avoidance to human feces with the oviposition index of −0.49 and −0.38, respectively. Propionic acid dramatically delayed the developmental duration of their progeny and reduced the survival rate in a dosage-dependent manner, and 2% propionic acid caused death of larvae. 【Conclusion】*D. melanogaster* female adults repel to lay eggs on food with propionic acid through the olfactory system, and this behavior promotes the development of *D. melanogaster* larvae and boosts the survival rate of their offspring.

Key words: *Drosophila melanogaster*; oviposition avoidance; propionic acid; human feces; developmental duration; survival rate

近一个世纪以来，黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 是研究基本生物学有价值的一种模式生物，对遗传与发育生物学发展做出了巨大的贡献（Koon and Chan, 2017）。20 世纪 60 年代，Benzer 首先应用果蝇来研究行为的神经分子机制，开辟了一个崭新的研究领域（Benzer, 1967）。为使物种繁衍延续和满足后代良好的生存环境，雌果蝇在产卵之前要综合多种因素，比如温度、湿度、营养条件、毒素、天敌等，最终选择合适的地方产卵（Richmond and Gerking, 1979; Yang *et al*., 2008），从而有效地避免有毒物质的侵害，促进后代的生长发育、提高存活率（Kinzner *et al*., 2016）。果蝇的产卵行为较易观察和量化，是研究果蝇行为的良好选择（王艺瑾等, 2012）。

研究发现，乙酸可以吸引果蝇产卵（Joseph *et al*., 2009），即果蝇产卵对乙酸具有偏嗜性，然而目前对这个行为的生物学意义知之甚少。腐烂的水果成为果蝇的主要食物来源，里面栖息着大量好氧菌，如乙酸杆菌，发酵碳水化合物而产生乙酸。因此有学者推测，乙酸可能是一种信号分子，吸引果蝇到腐烂水果上面产卵（Lee and Brey, 2013）。然而环境微生物发酵作用除了产生乙酸外，在局部厌氧条件下还产生大量丙酸、丁酸、异丁酸、戊酸等挥发性脂肪酸。这些挥发性脂肪酸碳原子比乙酸多，酸性稍降低，但均具有强烈刺激性气味，可能会在体外影响一些动物行为（Ai *et al*., 2010）。丙酸和丁酸具有刺激性气味，并且具有酸性，我们推测其可能对果蝇生长发育不利。嗅觉在感受环境中有害信号过程中起着非常关键的作用，让动物及时地产生行为免疫，避开有害物质（Larter *et al*., 2016）。前人研究表明，果蝇通过嗅觉系统感知酸性物质，并产生一定行为变化（Ai *et al*., 2010）。据我们所知，目前仍未有研究丙酸和丁酸对果蝇的产卵行为的报道。

动物粪便由于肠道微生物发酵作用，富含细菌和营养物质，常常吸引腐生生物，如双翅目家蝇 *Musca domestica* 和屎壳郎 *Scarabaeus lamarcki* 等产卵。黑腹果蝇在腐烂水果上产卵，然而研究发现黑腹果蝇产卵对非洲东南部土著哺乳动物粪便具有显著避性反应（Mansourian *et al*., 2016），明显区别于其他腐生动物。细菌自身通常不影响果蝇产卵行为，但其代谢产物显著地影响果蝇产卵选择（刘威等, 2016）。因此，推测人粪便中挥发性脂肪酸可能影响果蝇产卵选择，是引起对哺乳动物的粪便产卵避性反应的原因。本研究利用双相选择产卵器检测果蝇对丙酸和丁酸的产卵偏嗜行为，检验丙酸与果蝇对人粪便产卵避性反应的相关性，并揭示其生物学意义。

1 材料与方法

1.1 果蝇品系和培养条件

雌性野生型黑腹果蝇 *D. melanogaster* 品系为 Oregon R（OR）和 Canton S（CS），雅库巴果蝇 *D. yakuba* 来自中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所果蝇资源与技术平台，酸感受突变体 *IR64a* 与 *IR76b* 来自 Bloomington 果蝇品系库。使用镊子将果蝇嗅觉器官触角摘除，让其恢复 24 h，然后检测其产卵行为。所有果蝇均用标准玉米粉-酵母食物，在温度 25℃，相对湿度 60% 条件下培养。培养光周期为 12L∶12D（Liu *et al*., 2012）。一般情况下，果蝇饲养使用玉米-酵母食物，由于酵母成分较复杂，易受酵母菌的影响，为了避免其对果蝇产卵行为的影响，行为学实验使用食物以水解酪蛋白作为蛋白来源（刘威等, 2017）。

1.2 试剂与仪器

试剂：乙酸（方正，≥99.5%）；丙酸、丁酸（国药集团，≥99.5%）；次氯酸钠（Sigma, 4.00% ~ 4.99%）；无水乙醇（方正，≥99.7%）。

仪器:37℃恒温培养箱(新苗,GNP9080BS-Ⅲ);25℃恒温恒湿培养箱(恒丰,WS-01Y);冷冻离心机(上海力申,Neofuge 13R)。

1.3 果蝇产卵行为

实验采用直径 60 mm、高 80 mm 的透明圆柱体装置(图1: A),在底部嵌入产卵的培养皿(Joseph *et al.*, 2009)。该培养皿里面装有果蝇食物,右半侧装有添加某种待测物质(实验组),左半侧加入等量的水(对照组),构成果蝇产卵双选择装置,以供果蝇选择合适的产卵地点。实验中,果蝇食物经煮沸后冷却至 60 ~ 70℃将待测物溶入其中,倒入培养皿中。自然冷却后,用刀片从每种固体食物中间均匀地划开,将实验组与对照组食物手工拼装成双选择产卵地点,用底下螺旋组扣紧。每次实验选择 15 头新羽化的雌性果蝇与 3 ~4 头雄性果蝇,在涂有酵母膏的葡萄汁板上育肥 2 ~3 d,随后将果蝇转移到产卵装置,产卵 12 h,分别计数每一半食物上卵的数量。产卵指数(OI)=(实验组卵数 - 对照组卵数)/(实验组卵数 + 对照组卵数)。

第 1 组:粪便组,粪便样本取自 3 名 2 个月内未服用抗生素及毒品的健康人,称取 5 g,用 10 mL 1 × 磷酸盐缓冲液(1 L 成分及含量:磷酸二氢钾 0.27 g,磷酸氢二钠 1.42 g,氯化钠 8 g,氯化钾 0.2 g,pH 7.4)稀释,之后用 3 层纱布过滤掉残渣获得滤液(卓萍等, 2016),将滤液添加入果蝇食物中。添加粪便滤液果蝇食物为实验组,与对照食物组构成双选择产卵地点。实验重复 3 次。

第 2 组:粪便/水果组,粪便/水果产卵实验所用器具均经 121℃高压灭菌处理 20 min。取新鲜苹果去皮,分别经 1∶1 体积比稀释的次氯酸钠消毒 2 min,70% 乙醇消毒 2 次,1 min/次,于无菌容器中将已灭菌的苹果捣碎,转移至培养皿中。将 10^8 CFU 植物乳杆菌 *Lactobacillus plantarum* 接种到苹果泥中,36℃培养 48 h,获得发酵苹果泥。取人的新鲜粪便约 30 g,平铺于培养皿一侧,将发酵好的苹果转移至培养皿另一侧,组装成粪便/水果双选择产卵地点。实验重复 3 次。

第 3 组:丙酸/丁酸组,添加丙(丁)酸到果蝇食物中,作为一个实验组,与对照食物组构成双选择产卵地点。实验重复 4 次。

第 4 组:混合挥发性脂肪酸组,用总浓度 2% 乙酸与丙(丁)酸,按照一定比例加入食物中,作为一个实验组,与对照食物组构成双选择产卵地点。实验重复 3 次。

1.4 果蝇发育历期检测

在葡萄汁琼脂板(700 mL H_2O, 30 g 琼脂, 300 mL 葡萄汁, 30 g 蔗糖)上涂抹酵母膏,令果蝇在产卵器中产卵,收集 8 h 内产的卵,分别注入不同浓度丙酸食物中,每日记录 0, 0.5%, 1.0% 和 2% 丙酸培养基中果蝇形成蛹和羽化为成虫的数量($n = 40$),分别计算蛹形成和羽化出现的平均时间。实验重复 4 次。

1.5 果蝇存活率检测

育肥后的果蝇于收集器中产卵,用葡萄汁琼脂板收集 8 h 内的卵,分别转移 40 粒卵到不同浓度丙酸食物或足量人粪便上,累积计数蛹和成虫的数目,存活百分率 = 蛹或者成虫数目/总卵数目 ×100%。实验重复 4 次。

1.6 数据分析

使用 Excel 软件整理分析数据,计算平均值(mean)与标准误(*SE*)。用 SPSS 软件对每组值显著性进行单样本 *t* 检验(one sample *t*-test),各处理组间的差异采用 *t* 检验分析(Student *t*-test)。用 Graphpad 和 Adobe Illustrator 软件制图。

2 结果

2.1 果蝇对人粪便的产卵避性反应

为检测人粪便对果蝇产卵选择的影响,分别在果蝇食物中加入 3 个健康人的粪便滤液(P1, P2 和 P3),与对照组食物构成双选择(2-choice)产卵方式(图 1: A)。结果表明,果蝇产卵对 3 个人粪便均具有显著的避性反应。在粪便浓度为 0.5% 时,雌性野生型果蝇 Oregon R(OR)在 3 个人粪便一侧产卵比例分别为 9.0%, 5.5% 和 16.5%,其对应的产卵指数分别为 -0.82, -0.89 和 -0.67(图 1: B),产卵避性反应并不随浓度增大持续增大,可能是粪便中复杂成分综合作用的结果。为了进一步比较果蝇产卵对腐烂水果与粪便偏嗜性间的差异,用植物乳杆菌发酵的苹果泥和人粪便拼成双选择产卵方式。结果显示,野生型果蝇(OR)仅将 1.5% 的卵产在粪便一侧,产卵指数高达 -0.97(图 1: C),进一步说明与腐烂水果相比较,果蝇产卵强烈地避开人粪便。将果蝇卵放置到人粪便中,观测人粪便是否可以支持果蝇发育。结果显示,卵在粪便中能够孵化出幼虫,少数可以发育到 3 龄幼虫和蛹,但不能羽化为成虫,成虫存活率为 0(图 1: D),说明粪便不能支持果蝇正常发育。然而,对照组果蝇卵在玉米-酵母食

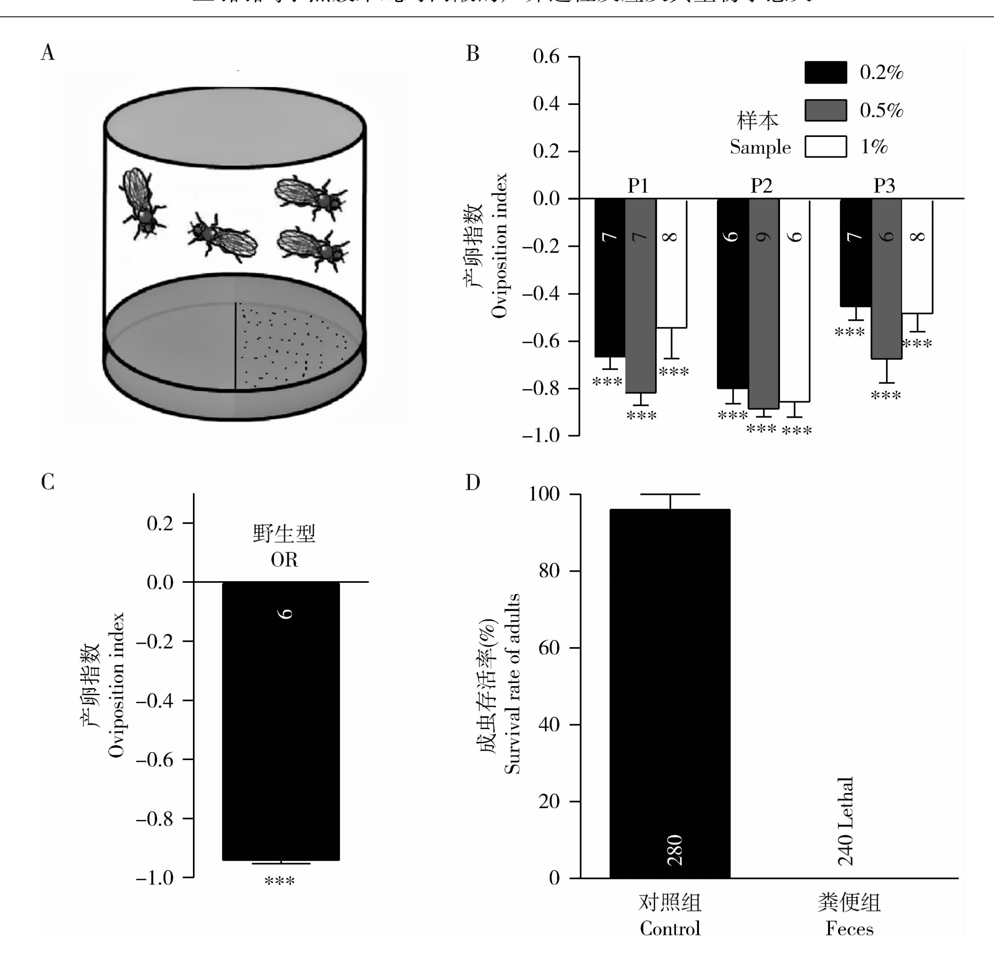


图 1　黑腹果蝇雌性成虫对人粪便的产卵避性反应

Fig. 1　Oviposition avoidance of *Drosophila melanogaster* female adults to human feces

A：产卵偏嗜性测试实验装置，底部为直径 6 mm 培养皿，装有果蝇食物，右半侧装有添加处理物质（实验组），左半侧加入等量的水（对照组） A diagram of the oviposition preference assay. The apparatus was presented a 6 mm dish in which one-half contains food mixed with a compound of choice (experimental food), and the other contains food mixed with an equivalent volume of water (control food). B：浓度为 0.2%，0.5% 和 1% 人粪便对野生型果蝇 Oregon R（OR）产卵偏嗜性的影响，其中 P1，P2 和 P3 为 3 个人的粪便样本 Effect of human feces at the concentrations of 0.2%，0.5% and 1% on oviposition preference of wild-type Oregon R (OR). P1, P2 and P3 represent human feces of 3 individuals. C：在人粪便-发酵苹果双相选择中果蝇产卵指数，发酵苹果组计算时作为对照组，粪便组作为处理组 The oviposition preference in two-choice of human feces and fermented apple. When the oviposition index was calculated, the fermented apple pie was used as the control food and feces as the experimental food. D：人粪便对野生型 Oregon R（OR）果蝇成虫存活率的影响 Effect of human feces on the survival rate of adults of wild-type Oregon R (OR). 玉米-酵母食物组为对照组；下图同。图中数据为平均值 ± 标准误。三星号表示差异显著（$P<0.001$，单样本 t 检验）。柱内数值为每组实验总样本数 n。Corn-yeast food group was used as the control, and the same for the following figures. Data in the figure are mean ± *SE*. Triple asterisk means significant difference ($P<0.001$, one sample *t*-test). The total number n of samples is shown inside each bar.

物中能够正常发育至蛹和成虫，成虫存活率为 96%。

2.2　果蝇产卵对乙酸、丙酸和丁酸的选择性

利用双选择产卵器检测果蝇对乙酸产卵偏嗜性，结果显示，在一定浓度范围内（<5%），果蝇产卵指数随乙酸浓度增大而增大，在 2% 浓度时，产卵指数为 0.47（图 2：A），说明乙酸可作为引诱剂量吸引果蝇产卵。粪便同时含有丰富的丙酸和丁酸，然而果蝇产卵排斥丙酸，即对丙酸产生明显的避性反应，且避性反应均随酸浓度的增大而增强，与乙酸效应完全相反，在 1% 浓度时，产卵指数为 -0.77（图 2：B）。同样，果蝇产卵对丁酸产生明显的避性反应（图 2：C），与同浓度丙酸比较，丁酸产生更强的排斥效应，在 1% 浓度下产卵指数可达 -0.98。为了简便，后续实验主要以丙酸为代表，研究其对果蝇产卵的影响。黑腹果蝇另外一个品系 Canton S（CS）和 OR 果蝇一致，对丙酸也具有避性反应，对 1% 丙酸的产卵指数为 -0.82（图 2：D）。黑腹果蝇近亲雅库巴果蝇 *D. yakuba* 产卵对丙酸也有显著的避性反应，但避性反应明显低于黑腹果蝇，对 1% 丙酸的产卵指数为 -0.23（图 2：D），说明果蝇对丙酸的避性反应具有保守性，但在不同种内又存在一定差异。

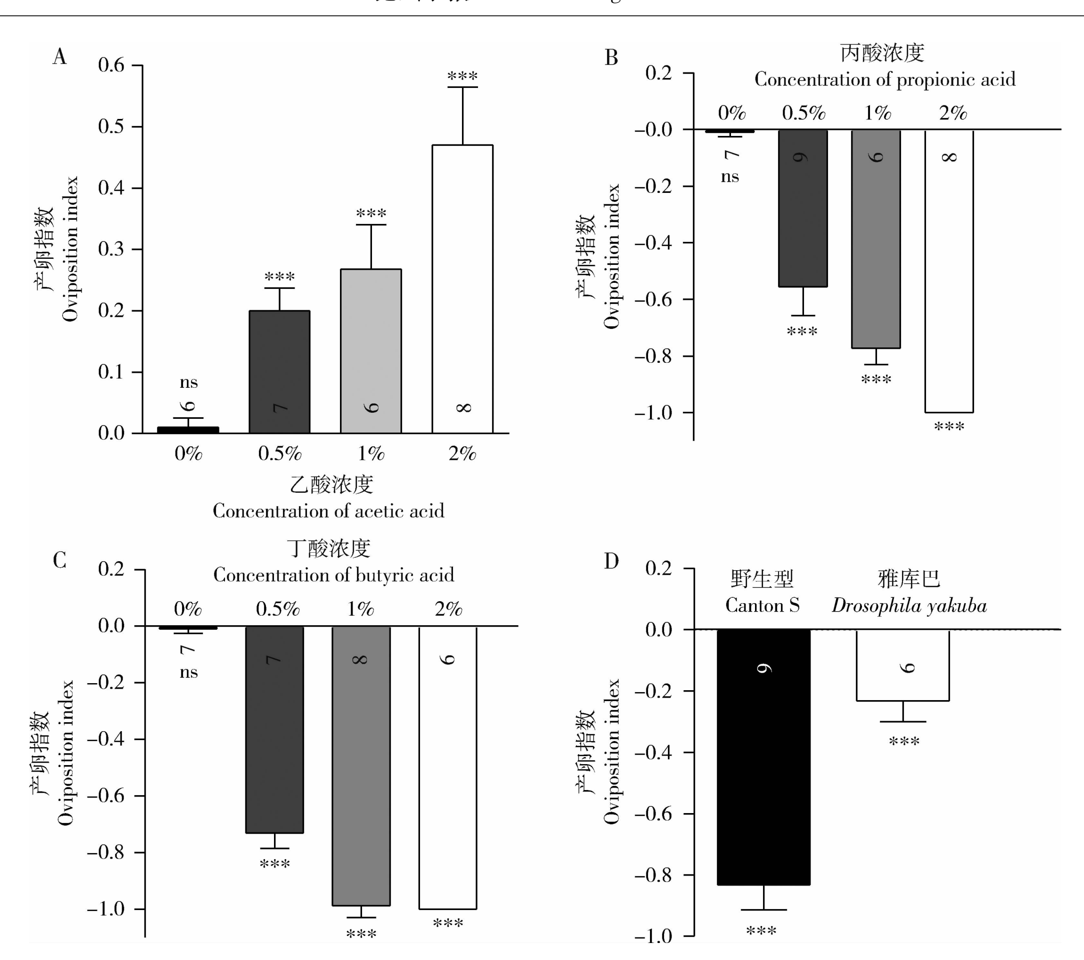


图 2　黑腹果蝇雌性成虫对乙酸、丙酸和丁酸的产卵选择性

Fig. 2　Oviposition selection of *Drosophila melanogaster* female adults to acetic acid, propanoic acid and butyric acid

A: 乙酸对 Oregon R (OR)果蝇产卵偏嗜性的影响 Effect of acetic acid on oviposition preference of Oregon R (OR); B: 丙酸对 Oregon R (OR)果蝇产卵偏嗜性的影响 Effect of propanoic acid on oviposition preference of Oregon R (OR); C: 丁酸对 Oregon R (OR)果蝇产卵偏嗜性的影响 Effect of butyric acid on oviposition preference of Oregon R (OR); D: 1% 丙酸对 Canon S (CS)和雅库巴果蝇产卵偏嗜性的影响 Effect of 1% propanoic acid on oviposition preference of Canton S (CS) and *D. yakuba*. 图中数据为平均值 ± 标准误。单样本 *t* 检验分析差异显著性(ns, $P > 0.05$; ***, $P < 0.001$)。柱内数值为每组实验总样本数 n。Data in figure are mean ± *SE*. Significance of difference was analyzed by one sample *t*-test (ns, $P > 0.05$; ***, $P < 0.001$). The total number n of samples is shown inside each bar.

2.3　嗅觉系统介导果蝇产卵对丙酸和人粪便的避性反应

果蝇嗅觉感受器主要存在于果蝇触角内(Chen and Amrein, 2014),触角摘除完全破坏了果蝇产卵对1% 丙酸的避性反应($P < 0.001$),产卵指数 −0.05(图 3: A),说明嗅觉系统介导了果蝇产卵对丙酸的避性反应。相比 OR 果蝇,酸感受突变体 *IR64a* 产卵对 0.5% 丙酸的避性反应完全消失($P < 0.001$),产卵指数为 −0.07(图 3: B),另一个酸感受突变体 *IR76b* 对 0.5% 丙酸的避性反应也明显减弱(图 3: B),产卵指数为 −0.17($P < 0.05$)。这些结果表明嗅觉系统中酸感受神经元介导果蝇对丙酸的产卵选择。选用 0.5% 的粪便样本,无触角果蝇对粪便的产卵避性反应被严重削弱($P < 0.05$),产卵指数为 −0.35(图 3: C),说明嗅觉系统介导了果蝇产卵对粪便的避性反应。值得注意的是,无触角果蝇对粪便仍然具有避性反应,提示可能粪便中存在其他物质也可以引起果蝇的避性反应。同理,*IR64a* 对人粪便的产卵避性反应明显减弱($P < 0.01$),产卵指数由 −0.82 增大至 −0.49;*IR76b* 的产卵指数(−0.38)虽也有减弱趋势,但效果不甚明显(图 3: D),说明酸感受通路介导了果蝇对人粪便产卵的避性反应。同样地,*IR64a* 与 *IR76b* 突变体对粪便产卵的避性反应仍存在,提示粪便中可能还有其他复杂成分影响着果蝇的产卵行为。

2.4　挥发性脂肪酸联合作用影响果蝇产卵选择

鉴于乙酸和丙酸、丁酸对果蝇产卵有相反的作用,将乙酸和丙酸或者乙酸和丁酸保持 2% 总浓度,

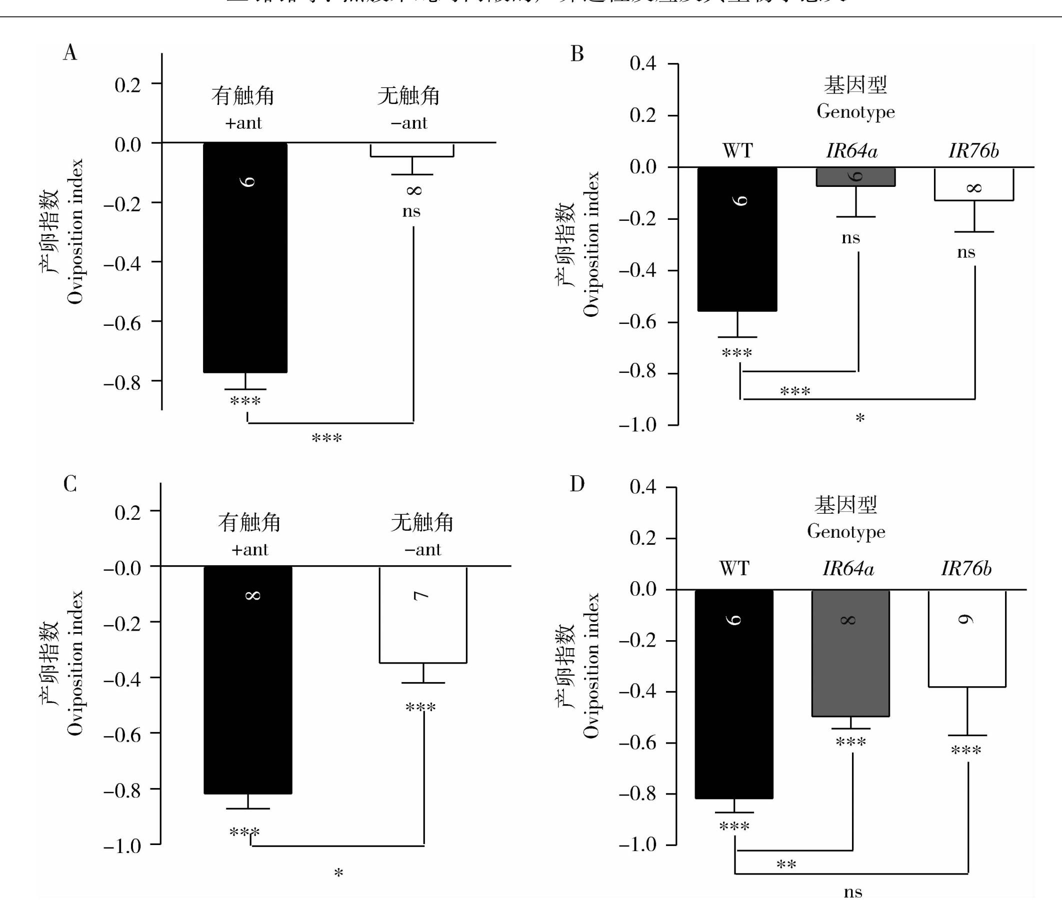


图 3　嗅觉系统介导黑腹果蝇 Oregon R（OR）品系雌性成虫产卵对丙酸和人粪便的避性反应

Fig. 3　Olfactory system mediates the oviposition avoidance of *Drosophila melanogaster* Oregon R（OR）female adults to propanoic acid and human feces

A：剪除触角雌性果蝇对 1% 丙酸产卵避性反应减弱 The oviposition avoidance of *D. melanogaster* female adults without antenna to 1% propanoic acid was impaired；B：酸感受突变体 *IR64a* 与 *IR76b* 对 0.5% 丙酸的产卵避性反应降低 The oviposition avoidance to 0.5% propanoic acid in *IR64a* and *IR76b* mutants decreased；C：剪除触角雌性果蝇对 0.5% 人粪便产卵避性反应减弱 The oviposition avoidance of *D. melanogaster* female adults without antenna to 0.5% human feces was impaired；D：*IR64a* 与 *IR76b* 突变体对人粪便的产卵避性反应降低 The oviposition avoidance to human feces in *IR64a* and *IR76b* mutants decreased. ＋ant：有触角（对照）Antenna（control）；－ant：无触角 Antenna removed；WT：野生型（对照）Wild type（control）. 图中数据为平均值 ± 标准误。各处理组间差异采用 *t* 检验分析（ns，$P>0.05$；*，$0.01<P<0.05$；**，$0.001<P<0.01$；***，$P<0.001$）。柱内数值为每组实验总样本数 n。Data in the figure are mean ± *SE*. Difference between groups was analyzed by Student *t*-test（ns，$P>0.05$；*，$0.01<P<0.05$；**，$0.001<P<0.01$；***，$P<0.001$）. The total number n of samples is shown inside each bar.

调节两种酸的比例，以检测果蝇产卵偏嗜性。结果显示，当乙酸/丙酸为 7∶1时，果蝇产卵对加酸食物表现出较强偏好性，产卵指数为 0.49，随着丙酸比例升高，果蝇产卵偏嗜性由对有酸食物的偏好性渐转为避性反应（图 4：A），当两者比例达到 1∶7时产卵指数为 －0.45。同理，随着丁酸比例升高，果蝇产卵偏嗜性也由对有酸食物的偏好性渐转为偏恶性（图 4：B）。上述结果说明，果蝇综合对乙酸偏好性和对丙酸偏恶性，从而做出最终的产卵选择，为两种相反的偏嗜行为中和的结果，即如果偏好性大于偏恶性，则喜欢在含有酸一侧产卵，否则躲避在含有酸一侧产卵。

2.5　丙酸对果蝇发育历期与存活率的影响

将果蝇卵转移到含有不同浓度丙酸食物中，记录卵发育到蛹和成虫的发育历期。数据显示，随丙酸浓度增大，蛹和成虫的发育历期逐渐延长，其中 0.5% 浓度时，蛹的发育历期比对照组延长 1.3 d，成虫则延长 1.8 d，差异显著（$P<0.001$）。当丙酸浓度达到 2% 时，果蝇停滞在 1 或者 2 龄幼虫阶段而无法继续向下一阶段发育，严重延缓果蝇的发育历期（图 5：A），说明丙酸可能对果蝇发育产生毒害作用。为了进一步验证丙酸对果蝇发育的毒性，计算蛹和成虫的存活率。与发育历期受阻相一致，蛹和成虫的存活率也随丙酸浓度增大逐渐降低，1% 浓度时蛹和成虫存活率分别降低至 23% 和 24%，与对照组有差异明显（$P<0.01$），2% 浓度时甚至死亡（图 5：B）。这些结果与图 1（D）中果蝇无法在人粪便里发育出成虫相一致，说明丙酸可能是导致果蝇无

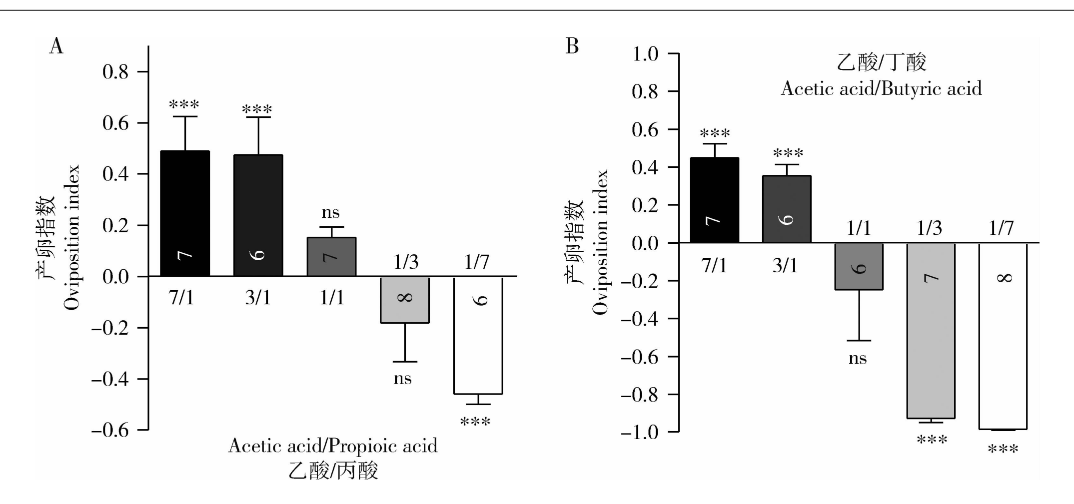


图 4 挥发性脂肪酸联合作用影响黑腹果蝇 Oregon R (OR)品系产卵选择

Fig. 4 Combined effects of volatile fatty acids on oviposition selection in *Drosophila melanogaster* Oregon R (OR)

A：不同乙酸与丙酸浓度配比对果蝇产卵选择的影响 Effects of different ratios of acetic acid to propionic acid on oviposition selection in *D. melanogaster*；B：不同乙酸与丁酸浓度配比对果蝇产卵选择的影响 Effects of different ratios of acetic acid to butyric acid on oviposition selection in *D. melanogaster*. 图中数据为平均值 ± 标准误。单样本 *t* 检验分析差异显著性(ns, $P > 0.05$; ***, $P < 0.001$)。柱内数值为每组实验总样本数 n。Data in the figure are mean ± *SE*. Significance of difference was analyzed by one sample *t*-test (ns, $P > 0.05$; ***, $P < 0.001$). The total number n of samples is shown inside each bar.

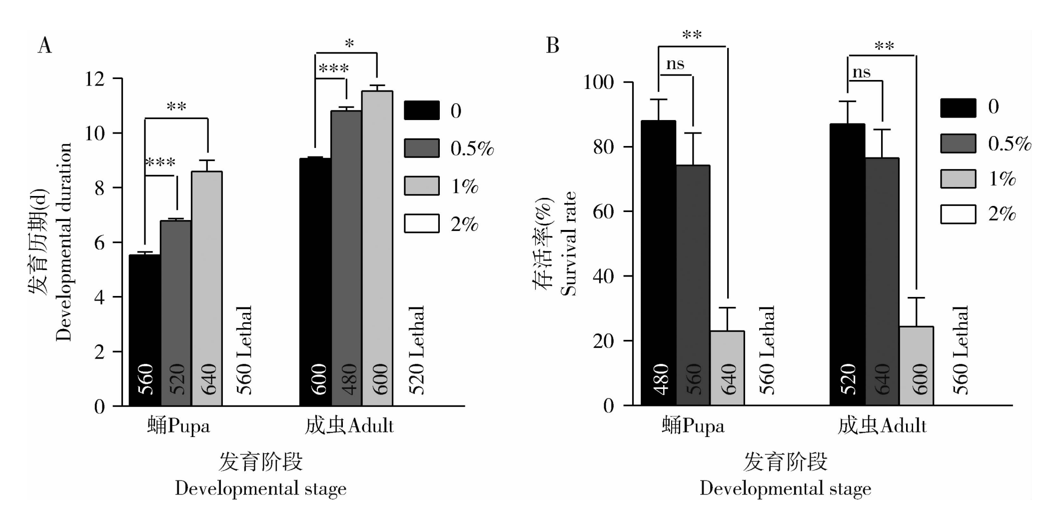


图 5 丙酸对黑腹果蝇 Oregon R (OR)品系蛹和成虫发育历期(A)与存活率(B)的影响

Fig. 5 Effects of propanoic acid on the developmental duration (A) and survival rate (B) of pupae and adults of *Drosophila melanogaster* Oregon R (OR)

丙酸浓度分别设置为 0(对照), 0.5%, 1% 和 2%。图中数据为平均值 ± 标准误。各处理组间差异采用 *t* 检验分析(ns, $P > 0.05$; *, $0.01 < P < 0.05$; **, $0.001 < P < 0.01$; ***, $P < 0.001$)。柱内数值为每组实验总样本数 n。Concentrations of propanoic acid were 0 (control), 0.5%, 1% and 2%, respectively. Data in the figure are mean ± *SE*. Difference between groups was analyzed by Student *t*-test (ns, $P > 0.05$; *, $0.01 < P < 0.05$; **, $0.001 < P < 0.01$; ***, $P < 0.001$). The total number n of samples is shown inside each bar.

法在人粪便里发育的重要因素之一。

3 讨论

本研究发现黑腹果蝇产卵对丙酸和人粪便具有避性反应,嗅觉系统介导了这种行为。酸的气味是尖锐、辛辣的而有刺激性的,对动物机体有毒害作用。这种避性反应帮助果蝇避开丙酸等有害物质,促进后代发育,提高蛹和成虫的存活率。前人曾有研究,味觉系统介导果蝇对乙酸产卵的偏好性(Joseph *et al*., 2009),据推测,腐烂水果中的乙酸可能是一种信号分子,吸引果蝇到腐烂水果上产卵。果蝇中的某些嗅觉神经元可以特异性地感知酸性物质(Ai *et al*., 2010),从而趋利避害,有选择性地进

行产卵繁育后代。本研究中，丙酸相比于乙酸增多了一个碳原子，酸性稍降低，但其强烈刺激性气味却使得果蝇产卵产生明显的避性反应（图 2）。在乙酸与丙酸或丁酸同时存在时，果蝇能够权衡对乙酸的喜好与对丙酸或丁酸的厌恶，最终做出适宜的行为选择。*IR64a* 与 *IR76b* 均为离子通道型受体（ionotropic receptor，IR）家族的成员，其中 IR64a + 神经元为化学感应离子型谷氨酸受体家族 2 的一个成员，其投射到触角神经叶的 DC4 神经纤维球上，可被酸特异性激活，当 IR64a + 神经元损伤或 IR64a + 基因缺失时，果蝇对酸的感知能力严重受损，而对非酸性气味的反应却不受影响（Ai *et al.*，2010）。本研究发现，减掉触角的果蝇与 *IR64a* 及 *IR76b* 突变体对丙酸的产卵避性反应表现出不同程度的减弱（图 3），说明嗅觉系统介导了果蝇对丙酸的产卵避性反应，酸受体在果蝇感知丙酸的行为过程中起着重要作用。

苍蝇等腐生动物利用粪便中丰富的能量供给自身所需，对不同种哺乳动物的粪便均表现出产卵喜好，而黑腹果蝇则对哺乳动物的粪便显示强烈的产卵厌恶（Mansourian *et al.*，2016），而喜欢在腐烂的水果上产卵，这一现象与食肉动物粪便与腐烂水果中所含菌群不同有关。腐烂水果中的乙酸杆菌产生大量乙酸诱导果蝇产卵。人粪便中的厌氧菌在代谢过程中除了产生乙酸外，还产生大量丙酸和丁酸，对丙酸和丁酸的厌恶超过对乙酸的喜好，从而使得果蝇对人粪便表现出避性反应（图 1）。本研究采用剪除触角的果蝇与感知部分酸存在的 *IR64a* 和 *IR76b* 突变体检测果蝇对人粪便产卵的偏嗜性，结果显示产卵避性反应降低（图 3），说明果蝇可以通过嗅觉系统感知粪便中丙酸的存在，从而产生对粪便产卵的避性反应。研究还发现，果蝇产卵对粪便表现出的避性反应主要来源于嗅觉输入，其中 *Or46a* 嗅觉突变体失去了对苯酚气味的感知，对粪便的避性反应有明显减弱（Mansourian *et al.*，2016）。这也部分解释了 *IR64a* 和 *IR76b* 突变体仍然对粪便有避性反应，粪便中其他物质也可能引起果蝇的避性反应。

在自然界中，为提高个体和种群的适应性与生存能力，动物通过各个感觉器官识别、躲避潜在的危险（Kacsoh *et al.*，2013），从而最大限度地提高后代生存率与健康水平。研究发现，当果蝇看到黄蜂时，它们会转而在含酒精的食物中产卵，以保护孵化出来的幼虫免受感染（Kacsoh *et al.*，2013）。果蝇依赖视觉判断威胁子代生存的敌害，从而改变产卵行为以适应外界环境。我们的研究显示，黑腹果蝇通过识别判断食物中乙酸和丙酸的浓度比例权衡产卵喜好（图 4），有效地避开丙酸产卵，有利于后代的生长发育和提高存活率（图 5），很好地解释了果蝇对丙酸产卵的避性反应。丙酸使果蝇发育迟缓、存活能力降低的原因可能来自两个方面：其一，丙酸降低培养基的 pH 值，抑制宿主生长所需共生细菌的生长，从而延长果蝇的发育历期（Lee and Brey，2013）；其二，高浓度丙酸产生较强的毒性，导致果蝇死亡数增加，存活率降低。总之，果蝇对丙酸产卵的避性反应有重要的生物学研究意义，且与其避开人粪便产卵有一定关系。除了产卵，研究比较成熟的果蝇行为还有节律、打斗、求偶、觅食等（Ferveur，2010；Dahanukar and Ray，2011），丙酸对果蝇这些行为的影响仍有待探索。本研究加深了我们对果蝇在自然界生态位分布和进化的认知，同时也进一步证实果蝇产卵偏嗜行为是可利用的优秀模型之一。

参考文献（References）

Ai M，Min S，Grosjean Y，Leblanc C，Bell R，Benton R，Suh GS，2010. Acid sensing by the *Drosophila* olfactory system. *Nature*，468（7324）：691－695.

Benzer S，1967. Behavioral mutants of *Drosophila* isolated by countercurrent distribution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*，58（3）：1112－1119.

Chen Y，Amrein H，2014. Enhancing perception of contaminated food through acid-mediated modulation of taste neuron responses. *Curr. Biol.*，24（17）：1969－1977.

Dahanukar A，Ray A，2011. Courtship，aggression and avoidance：pheromones，receptors and neurons for social behaviors in *Drosophila*. *Fly*，5（1）：58－63.

Ferveur JF，2010. *Drosophila* female courtship and mating behaviors：sensory signals，genes，neural structures and evolution. *Curr. Opin. Neurobiol.*，20（6）：764－769.

Joseph RM，Devineni AV，King IF，Heberlein U，2009. Oviposition preference for and positional avoidance of acetic acid provide a model for competing behavioral drives in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*，106（27）：11352－11357.

Kacsoh BZ，Lynch ZR，Mortimer NT，Schlenke TA，2013. Fruit flies medicate offspring after seeing parasites. *Science*，339（6122）：947－950.

Kinzner MC，Tratter M，Bachli G，Kirchmair M，Kaufmann R，Arthofer W，Schlick-Steiner BC，Steiner FM，2016. Oviposition substrate of the mountain fly *Drosophila nigrosparsa*（Diptera：Drosophilidae）. *PLoS ONE*，11：e0165743.

Koon AC，Chan HY，2017. *Drosophila melanogaster* as a model organism to study RNA toxicity of repeat expansion-associated neurodegenerative and neuromuscular diseases. *Front. Cell.*

Neurosci., 11: 70.

Larter NK, Sun JS, Carlson JR, 2016. Organization and function of *Drosophila* odorant binding proteins. *eLife*, 5: e20242.

Lee WJ, Brey PT, 2013. How microbiomes influence metazoan development: insights from history and *Drosophila* modeling of gut-microbe interactions. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 29(6): 571–592.

Liu W, Jiang F, Bi X, Zhang YQ, 2012. *Drosophila* FMRP participates in the DNA damage response by regulating G2/M cell cycle checkpoint and apoptosis. *Hum. Mol. Genet.*, 21(21): 4655–4668.

Liu W, Li YJ, Liu XL, Zhuo P, Yao H, 2016. *Clistridium perfringens* promotes the growth and development of *Drosophila melanogaster*. *Acta Entomol. Sin.*, 59(5): 530–537. [刘威, 李玉娟, 刘晓梁, 卓萍, 姚红, 2016. 产气荚膜梭菌促进黑腹果蝇的生长和发育. 昆虫学报, 59(5): 530–537]

Liu W, Zhang K, Li EH, Xu HZ, Zhang C, 2017. *Escherichia coli* alters the oviposition preference in *Drosophila*. *Acta Entomol. Sin.*, 60(2): 173–179. [刘威, 张珂, 李恩惠, 徐皓哲, 张策, 2017. 大肠杆菌改变果蝇产卵偏嗜性. 昆虫学报, 60(2): 173–179]

Mansourian S, Corcoran J, Enjin A, Lofstedt C, Dacke M, Stensmyr MC, 2016. Fecal-derived phenol induces egg-laying aversion in *Drosophila*. *Curr. Biol.*, 26(20): 2762–2769.

Richmond RC, Gerking JL, 1979. Oviposition site preference in *Drosophila*. *Behav. Genet.*, 9(3): 233–241.

Wang YJ, Wen SY, Gong HY, Gong ZF, Liu L, 2012. A model system for analyzing behavioral preference and plasticity in *Drosophila* egg-laying. *Prog. Biochem. Biophys.*, 39(9): 910–918. [王艺瑾, 温省云, 龚海韻, 龚哲峰, 刘力, 2012. 果蝇产卵行为的偏好和可塑性实验模型. 生物化学与生物物理进展, 39(9): 910–918]

Yang CH, Belawat P, Hafen E, Jan LY, Jan YN, 2008. *Drosophila* egg-laying site selection as a system to study simple decision-making processes. *Science*, 319(5870): 1679–1683.

Zhuo P, Liu W, Liu JQ, Zhao PH, Cui FH, Li ZQ, 2016. Isolation, identification and metabolism of a *Veillonella* strain in human gut. *Microbiol. China*, 43(6): 1253–1261. [卓萍, 刘威, 刘君琴, 赵鹏花, 崔方慧, 李志强, 2016. 一株人消化道中韦荣氏球菌的分离、鉴定及其代谢特性研究. 微生物学通报, 43(6): 1253–1261]

(责任编辑: 马丽萍)